

Beitrag zur Aufklärung der
Frasblockstoffe von Hylobius
abietis L.
(Auszug)

Inauguraldissertation
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Friedrich Less
aus Wassertrüdingen / Mfr.

Fotodruck: DER MITTLER, Bamberg

1960

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Mai 1960.

Dekan : Universitätsprofessor Dr. W. Specht
Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. G. Hesse
Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. O. Dann

Beitrag zur Aufklärung der Fraßblock-
stoffe von *Hylobius abietis* L.

Die selektive Osmorezeption der Nahrung durch Insekten kann man zur Schädlingsbekämpfung ausnützen, indem man durch bestimmte Fraßblockstoffe nur die schädlichen Insekten an vergifteten Ködern zu vernichten bzw. in Geruchsfallen zu fangen vermag, ohne gleichzeitig die nützlichen in Mitleidenschaft zu ziehen.

Hylobius abietis L. macht sich besonders in jungen, 3 - 6-jährigen Fichten- und Kiefernplantagen durch seinen Schadfraß verheerend bemerkbar, da er durch das Abnagen von Rinde und Kambium den lebensnotwendigen Saftstrom unterbricht, was das Absterben der Pflanzen zur Folge hat.

G. Hesse, H. Kauth und R. Wächter (1;2) fanden 1952, daß dieser Forstschädling durch höhere ungesättigte Fettsäuren und deren Ester, welche auch im Bastsaft enthalten und nachgewiesen sind, angelockt werden kann. H.G. Dässler (3) konnte durch Luftbehandlung dieser Substanzen eine Steigerung der Lockwirksamkeit erzielen. Die vorliegende Arbeit setzt die Untersuchungen über die Fraßblockstoffe von *Hylobius abietis* bzw. *pinastri* fort.

Die für die Tests benutzten Käfer stammten aus den Nadelholzwäldern westlich von Erlangen ^x), welche überwiegend von Kiefern bestanden sind. Von den verschiedenen Möglichkeiten, Substanzen qualitativ und quantitativ auf ihre Lockwirksamkeit zu prüfen, gaben wir dem Naßblatttest (Testsubstanz auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b aufgetragen und mit 5%-iger Zuckerlösung gleichmäßig besprüht) den Vorzug, da er eindeutiger Ergebnisse als der

^x) Herrn Oberforstmeister Rettelbach und seinen Mitarbeitern vom Forstamt Erlangen-West danke ich vielmals für ihre freundliche Hilfe bei der Beschaffung von Rüsselkäfern und Bast.



Olfaktometer-Test lieferte. Es wurden insgesamt 1080 Naßblattteste ausgeführt, welche mehr als das Doppelte an Einzelwerten ergaben. Doch auch die Naßblattteste zeigten eine starke Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, wie Temperatur und Jahreszeit, sowie Beweglichkeit und Sättigungsgrad der Rüsselkäfer. Deshalb sind möglichst konstante Testbedingungen in geruchsfreien Räumen nötig. Ebenso mußte jedes Einschleppen von "repellents" bei der Extraktion und der weiteren Behandlung der natürlichen Extrakte mit Chemikalien vermieden werden, was durch entsprechende Reinigung der Reagentien erreicht wurde. Der in kleine Stücke geschnittene Bast frisch gefällter Bäume wurde ca. 4 Wochen unter CO_2 mit peroxyd- und säurefreiem Äther behandelt und dieser Extrakt mit kalter 1n wässriger NaOH wie üblich in saure (=Sren) und neutrale (=Ntl) Substanzen aufgeteilt. Dieser Behandlung wurde der Bast von Kiefer (=K), Fichte (=F) und Eiche (=E) unterworfen, wobei O_2 -freier N_2 bzw. CO_2 als Schutzgas dienten, um Autoxydation durch Luftsauerstoff auszuschließen. Der Kiefern-Neutralteil (=K Ntl) wurde in verschieden conc. (0,5 n und 18% KOH) alkoholischen Verseifungsmedien bei Temperaturen von 65, 80 und 118°C verseift, um so verseifbare (=Säuren aus der Neutralteil-Verseifung = Ntl-Sren) und unverseifbare (=Uvs) Bastextraktanteile zu trennen, und die Auswirkung dieser verschiedenen Verseifungsbedingungen auf letztere IR-spektroskopisch untersucht. Zur weiteren Analyse dieser Extraktanteile dienten besonders chromatographische Verfahren:

Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd (-Woelm sauer bzw. neutral) der Aktivitätsstufe 1 (für Rohextrakt, Sren, Ntl und Ntl-Sren);

Flüssigkeits-Verteilungschromatographie mit den Systemen Methanol/Wasser (60-85/40-15) - Cyclohexan und Aceton/Wasser (50-85/50-15) - Paraffinum liquidum auf hydrophobiertem Kieselgur als Träger der stationären unpolaren Phase (für Sren und Ntl-Sren; Titration mit n/100 methanolischer Lauge, Bromthymolblau als Indikator), nach Howard und Martin (4);

Verteilungs-Papierchromatographie mit 90- und 95%-iger Essigsäure bzw. Eisessig/Acetonitril (3:1) als mobiler und Paraf-

finum liquidum bzw. der Petroleumfraktion vom Kp. 190-195°C (3x dest.) als stationärer Phase auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b in Anlehnung an H.P. Kaufmann (5) (für Sren und Ntl-Sren sowie zum Vergleich und zur Reinheitsprüfung von gesättigten und ungesättigten reinen bzw. autoxydierten Fettsäuren); das System ist ausgezeichnet geeignet zur Trennung der drei ungesättigten C₁₈-Fettsäuren einerseits und zur Abtrennung der Autoxydationsprodukte von diesen Säuren andererseits;

Verteilungs-Gaschromatographie mit Apiezonfett M bzw. Reoplexsuccinatpolyester, Squalan, Polyäthylenglykol 1500 als stationäre Phasen auf Kieselgur bzw. Sterchamol und N₂ (weniger H₂) als Trägergas (für die leichtflüchtigen Öle des Rohextraktes, außerdem zum Vergleich und zur Reinheitsprüfung von Fettsäureestern und aliphatischen Aldehyden).

Die Bastextraktanteile und die davon durch Adsorptions- und Verteilungschromatographie erhaltenen Fraktionen wurden nach Möglichkeit quantitativ mittels Naßblatttest auf ihre Lockwirksamkeit geprüft:

(Zu den quantitativen Naßblatttestergebnissen: Unterstrichen bedeutet, daß praktisch alle Tests dieser Substanzmenge noch lockwirksam waren; (eingeklammert) bedeutet, daß weniger als 50% der Tests dieser Substanzmenge noch lockwirksam waren; ? bedeutet: Tests unsicher!)

<u>Extrakt-Anteil:</u>	<u>noch lockwirksame Menge in γ:</u>
Kiefern-Rohextrakt	<u>0,1 γ</u>
K Sren	1 γ (bis 0,1 γ)
K Ntl	<u>0,01 γ</u>
K Ntl-Sren	<u>0,01 γ</u> (bis 0,0001 γ)
K Uvs	0,01 γ (bis 0,001 γ ?)

Verteilungschromatographie von K Sren:	
Polare Anteile	0,05 γ bzw. <u>0,3 γ</u>
weniger polare Anteile	(2 γ ?)
Verteilungschromatographie von K Ntl-Sren:	
Polare Anteile	1 γ bzw. <u>30 γ</u> (+ Indikator!)
weniger polare Anteile	-

Adsorptionschromatographie
von K Ntl und K Sren an Al_2O_3 :

polarste Anteile	1g bzw. 10g (nicht weiter verdünnt!)
weniger polare Anteile	-

Fichten-Rohextrakt	1g
F Sren	1g
F Uvs	<u>1g</u>
(Die Fichtenextraktanteile wurden nicht so eingehend getestet!)	

Eichen-Rohextrakt	<u>0,1g</u>
E Sren	<u>1g</u>
E Ntl	<u>10g</u>

Die gute Lockwirkung der Eichen-Extraktanteile zeigt, daß die Lockstoffe für Hylobius nicht auf Nadelhölzer beschränkt sind. 3 - 4-stündige Behandlung von Fichten-Rohextrakt, F Ntl und K Uvs mit Wasserdampf ergab keine Steigerung der Lockwirksamkeit. Bei der Hochvakuum-Destillation des Kiefern-Rohextraktes und des mit Diazomethan veresterten Fichten-Rohextraktes verblieb die gesamte Lockwirksamkeit im pechartigen Destillationsrückstand, welcher bis auf $250^{\circ}C$ erhitzt worden war, während vom Destillat die zuerst übergehenden leichtflüchtigen Öle (Terpene) überhaupt keine, das darauf folgende hellgelbe, zähflüssige Destillat erst nach längerem Stehen an der Luft eine gewisse Lockwirkung zeigte. Die bei den verschiedenen säulenchromatographischen Verfahren und bei den Destillationen erhaltenen Fraktionen wurden jeweils papierchromatographisch auf gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und deren Ester untersucht.

Mit dieser Verteilungs-Papierchromatographie, besonders mit dem System Paraffinum liquidum - Eisessig/Acetonitril (3:1) konnte auch die Naßblattest-Technik verbessert werden, wenn nach der Entwicklung des Chromatogramms das Fließmittel mit dem größten Teil der stationären Phase im Vakuumtrockenschrank bei $115-120^{\circ}C$ entfernt, das Chromatogramm mit 5%-iger Zuckerlösung besprüht den Käfern für mehrere Stunden zum gefälligen Befraß überlassen wurde und hierauf nach Abwaschen des Zuckers und Trocknen durch Behandlung mit Osmium-

tetroxyd die ungesättigten Fettsäuren bzw. - Substanzen, sowie durch Baden in CuAc_2 -Lsg. und anschließend in saurer $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lsg. die gesättigten Fettsäuren indiziert wurden. So konnten auf demselben Chromatogramm sowohl die Fraßspuren der Käfer als auch die Flecken der chromatographisch getrennten Substanzen sichtbar gemacht werden.

Wie diese und die Naßblattteste der Adsorptions- und Verteilungschromatogramme zeigten, kommt die hauptsächliche Lockwirksamkeit den Substanzen zu, welche stärker polar als die dreifach-ungesättigten C_{18} -Fettsäuren sind, welche ihnen an Attraktivität nachstehen. In diesen R_f -Wert-Bereich fallen die Autoxydationsprodukte der ungesättigten Fettsäuren.

Als Vergleichssubstanzen, deren Reinheit gaschromatographisch und papierchromatographisch überprüft worden war, und welche teilweise in den Bastextrakten nachgewiesen worden waren, wurden gesättigte (C_4 -, C_5 -, C_6 -, C_7 -, C_8 -, C_9 -, C_{12} -, C_{16} -, C_{18} -, C_{20} -, C_{22} - und C_{24} -Säuren) und ungesättigte (Linolen-, Linol-, Öl-, Elaidin-, Lebertran-, Rizinol-, Undecylen- und Δ -2-Hexensäure) Fettsäuren und deren Ester (Linolen-, Linol-, Lebertran-, Matricariasäuremethylester) sowie eine Reihe anderer Substanzen (Abietin-, Bernstein-, Traumatol-, Gallussäure, Pyrogallol und Tannin) getestet. Von den gesättigten Fettsäuren hatte Stearinsäure mit 10% die größte Lockwirksamkeit, alle anderen hatten geringere, keine eindeutige (Önanthensäure Ende April 1%?, Anfang Juli 100%?) oder gar keine Lockwirksamkeit. Von allen getesteten Vergleichssubstanzen zeigte Linolensäure (aus der Harnstoffeinschlußverbindung hergestellt) mit noch 0,1% die größte Lockwirksamkeit. Von frischer Linolsäure waren 10%, von autoxydierter 1%, von Ölsäure 100% (1%?), von Lebertranfettsäuren 100%, von Δ -2-Hexensäure 10% bis 1%, von Undecylensäure 100% (?) noch lockwirksam. Der Matricariaester, als die höchstungesättigte Substanz (zwei Doppel- und zwei Dreifachbindungen), ergab praktisch keinen Anlockeffekt. Aus den Testen geht also hervor, daß bei den geradkettigen C_{18} -Fettsäuren die Lockwirksamkeit mit der Zahl der Doppelbindungen einerseits und durch Autoxydation

andererseits zunimmt. Durch einstündige intensive UV-Bestrahlung oder durch Alkali-Isomerisierung mittels 21%-iger glykolischer KOH bei 180°C konnte die Lockwirksamkeit von Linolensäure nicht beeinflusst werden (allerdings Mitte Juli und August getestet!), dagegen schon durch 3,5-stündige nasse Autoxydation bei 20°C. Durch verteilungschromatographische Abtrennung der Autoxydationsprodukte von autoxydierter (mit H₂O-gesättigter Luft 62 h bei 20°C) Linolensäure konnte für diese Autoxydationsprodukte allein sehr gute Lockwirksamkeit festgestellt werden, wenn direkt aus dem Eluat getestet worden war; Eindampfen der Lösung, sowie Zusatz von Indikator verringerte die Lockwirkung auf etwa den hundertsten Teil.

Auch die flüchtigen Autoxydationsprodukte von Linolen- und Linolsäure bzw. deren Ester, welche meist unter Zusatz von Fe-Stearat durch langsames Durchsaugen von trockener bzw. H₂O-gesättigter Luft bei 18°C, 32°C oder 52°C erhalten worden waren, wurden auf ihre Zusammensetzung und Lockwirkung untersucht. Diese flüchtigen Autoxydationsprodukte setzten sich hauptsächlich aus gesättigten und α , β -ungesättigten aliphatischen Aldehyden zusammen (Nachweis durch papierchromatographischen Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazone in den Systemen Dimethylformamid - n-Hexan/Paraffinöl und Undecan - Äthanol/Wasser (80:20) mit reinen Vergleichssubstanzen, sowie durch UV-Spektroskopie der so getrennten 2,4-DNPH in neutraler und alkalischer Lösung nach der Methode von Jones, Holmes und Seligman (6)). Lockwirksamkeit im Naßblatttest zeigten die bei der Autoxydation erhaltenen und in einer Kühlfalle von $t < -30^\circ\text{C}$ aufgefangenen flüchtigen Autoxydationsprodukte in ihrer Gesamtheit ebenso wenig bzw. unsicher wie die als Vergleichssubstanzen getesteten Carbo-nylverbindungen: Heptanal, Hexanal, Δ -2-Hexenal und Malondialdehyd (teilw. zersetzt). Carbonsäuren können, wie ein Vergleich zwischen Gewichtszunahme und Säurezahl zeigt, in den hier erzeugten ersten Autoxydationsstufen noch nicht entstanden sein. Es ist jedoch möglich, daß ein überaus unbeständiges und daher nicht faßbares (u.U. flüchtiges) Sekundärprodukt aus diesen u.U. verschiedenen Autoxydationspro-

dukten entsteht, dem die eigentliche Lockwirkung zukommt. Bei Vernachlässigung dieser letzteren Möglichkeit muß es sich bei dem wirksamen Lockstoff um eine schwerflüchtige, thermisch ziemlich stabile (bei 250°C und 0,2 mm Hg noch nicht flüchtig!), also entweder um eine polymere Substanz oder eine Substanz mit siedepunktserhöhenden Gruppen, wie Hydroxyl- oder Carboxylgruppen, oder beides zugleich handeln. Der Reaktionsmechanismus der ersten Stufen der Autoxydation (Zwischenschieben eines O₂-Moleküls in eine aktivierte CH₂-bindung = α -Methylen-Mechanismus, anschließende Allylumlagerung des entstandenen Hydroperoxyds zum konjugierten Hydroperoxyd und Diensynthesen als Folgereaktionen, sowie eine mögliche Spaltung der benachbarten C-C-Bindung durch Eingriff der Peroxydgruppe usw.) sowie die Ergebnisse der UV- und IR-spektroskopischen Untersuchungen der lockwirksamen Fraktionen lassen gleichfalls beide Möglichkeiten zu.

Die Beobachtung, daß die lockwirksamen Stoffe aus den Bastextrakten besser befreissen wurden als die Autoxydationsprodukte der reinen Leinölfettsäuren, kann vielleicht damit erklärt werden, daß die ungesättigten Fettsäuren nur auf einer bestimmten Autoxydationsstufe lockwirksam sind, die durch Begleitstoffe im Bast stabilisiert wird (deshalb vielleicht auch so temperaturbeständig), daß die Autoxydation der ungesättigten Fettsäuren durch ihre Partner im Bastextrakt gesteuert wird, oder daß die spezifische Lockwirkung keinem Einzelstoff, sondern einer ganz bestimmten Kombination von Stoffen zukommt. Bei allen Testen, bei welchen die zu testende Substanz in entsprechender Verteilung (z.B. auf Watte oder Papier) mit Luft und Feuchtigkeit in Berührung kommt, ist außerdem, selbst wenn es sich um völlig reine ungesättigte Substanzen handelt, bereits nach wenigen Stunden (Testdauer!) mit Autoxydation zu rechnen. Andererseits kann bei bereits autoxydierter und somit lockwirksamer Substanz durch diese Bedingungen weitere Autoxydation und damit wieder Minderung der Lockwirksamkeit eintreten.

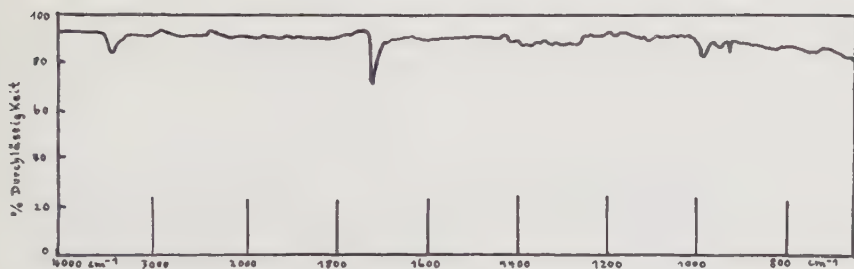
Bei anderen Fraßlockstoffen hat man gefunden (7), daß bereits

kleine Unterschiede in der chemischen Struktur, z.B. cis-trans-Isomerie, große Unterschiede im Anlockeffekt bewirken. Solche Möglichkeiten der Strukturänderung sind nun bei den langen Fettsäuremolekülen auch schon ohne Autoxydation gegeben, wie z.B. Verschiebung der Doppelbindungen, teilweise oder vollständige Konjugierung der Doppelbindungen und cis-trans-Isomerie. Auch der Einfluß von Licht, Sensibilisatoren und Katalysatoren (wie etwa Fe-Verbindungen) ist für die Autoxydation sehr wesentlich.

Orientierende Naßblattteste (Anfang Mai) mit Borkenkäfern - ob *Ips typographus* oder *Ips sexdentatus*, wurde dabei nicht unterschieden - ergaben eine gute Lockwirksamkeit des Kiefern-Rohextraktes und ebenso der polaren Anteile von K Sren aus der Verteilungsschromatographie. Man könnte deshalb auch die noch ungeklärte Frage, warum Borkenkäfer besonders bei Windbruch und bei geschwächten Bäumen massenhaft auftreten, was also zweifellos einen besonderen Anlockeffekt darstellt, vielleicht als eine Autoxydation der Fettsäuren bzw. Ester durch Verschiebung des Fermentgleichgewichtes infolge des unterbrochenen Saftstromes im Sinne eines Verbrauches reduzierender Substanzen und somit einer gesteigerten Angriffsmöglichkeit des Luftsauerstoffs deuten. Dies wäre dann wohl auch das "attractant" für die Borkenkäfer an gefällten Bäumen, sowie für die Rüsselkäfer an den Fangprügeln.

Die ungesättigten C_{18} -Fettsäuren bzw. deren Ester könnte man dann als "Prolockstoffe" - in Analogie zum Provitamin - bezeichnen, weil durch die Einwirkung des Luftsauerstoffs (+ Wasser + Licht ?) erst der eigentliche Lockstoff entsteht.

Die durch Autoxydation eingetretenen Veränderungen konnten beim Linolsäuremethylester durch Aufnahme eines IR-Kompensationsspektrums (frisch dest. Linolsäuremethylester in den Vergleichsstrahl und 95 h bei 15°C trocken autoxydierten Linolsäuremethylester in den Meßstrahl geschaltet) gezeigt werden:



OH Streckschwingung bei 3450 cm^{-1} ; C=O Streckschwingung bei 1717 cm^{-1} ; drei kleinere Banden bei 925, 940-50 und 981-85-990 cm^{-1} sind wohl Peroxydschwingungen zuzuordnen (peroxydischer Sauerstoff auch chemisch bestimmt!).

Den UV-Spektren aller lockwirksamen Fraktionen waren (außer den Maxima bei 206-210 $\text{m}\mu$ bzw. 216 $\text{m}\mu$ für Carboxyl-, Ester- bzw. Sterin-Gruppierung) Maxima oder ausgeprägte Schultern nahe 230 und 280 $\text{m}\mu$ gemeinsam: Konjugierte Diene und wahrscheinlich konjugierte Triene. Das durch Alkali-Isomerisierung erhaltene Maximum bei 345 $\text{m}\mu$ in Verbindung mit einem bei der Papierchromatographie erhaltenen Fleck einer ungesättigten Säure zwischen den R_f -Werten von Linolensäure und den Autoxydationsprodukten sowie der größten Lockwirkung dieses Anteils könnte auf das Vorhandensein einer höher als dreifach ungesättigten Säure in K Ntl-Sren hinweisen.

Literaturangaben:

- 1) G.Hesse, H.Kauth u.R.Wächter: Zeitschrift f.angewandte Entomologie, Band 37, Heft 2, 239 (1955).
- 2) R.Wächter: Dissertation, Freiburg i.Br. 1952.
- 3) H.G.Dässler: Anzeiger f.Schädlingskunde 31, 153 (1958).
- 4) G.A.Howard u.A.J.P.Martin: Biochem. J. 46, 532 (1950).
- 5) H.P.Kaufmann: Fette-Seifen-Anstrichm. 60, 165 (1958).
- 6) L.A.Jones, J.C.Holmes u.R.B.Seligman: Analyt.Chem. 28, 191 (1956).
- 7) Angew. Chem.: Nachrichten a.Chem.u.Technik: 7, Nr.22, 377.

L e b e n s l a u f .

Ich, Friedrich Less, wurde am 26.7.1933 als Sohn des Bankkaufmanns Robert Less und seiner Gemahlin Cordula Less, geb. Leicht, zu Wassertrüdingen in Mittelfranken geboren. Der Beruf meines Vaters führte unsere Familie im Jahre 1938 nach Passau. Dort besuchte ich von 1939 bis 1943 die Volksschule und anschließend das humanistische Gymnasium. Da mein Vater 1949 nach Fürth i. Bay. versetzt wurde, setzte ich ab September 1950 den Schulbesuch am humanistischen Gymnasium Fürth fort. Hier bestand ich 1952 die Reifeprüfung.

Im November desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Universität Erlangen für das Studium der Chemie. Im November 1955 legte ich hier die Diplomchemikervorprüfung ab. Der mündlichen Diplomchemikerhauptprüfung unterzog ich mich am 3. Juli 1957 und erhielt nach Ausführung der Diplomarbeit am 4. März 1958 das Diplomzeugnis ausgehändigt. Bis Dezember 1959 war ich mit der Ausführung meiner Dissertation beschäftigt.

